

· 研究原著 ·

文章编号: 1000-2790(2000)03-0314-03

结肠癌中 p73 基因改变的意义

李陕区¹, 崔大祥¹, 刘变英², 闫小君¹, 孙安乐², 郭宴海¹, 段杰¹, 苏成芝¹(¹ 第四军医大学全军基因诊断技术研究所, 陕西 西安 710033, ² 太原市第 264 医院内镜中心)**关键词:** 结肠癌; p73 基因; 定量 RT-PCR**中图分类号:** R738.1 **文献标识码:** A

摘要: **目的** 研究 p73 基因在结肠癌中的改变及其意义 **方法** 采用 PCR-SSCP 方法检测 40 例结肠癌及其癌旁非癌组织中 p73 基因突变, 采用定量 RT-PCR 方法检测 p73 基因的表达 **结果** PCR-SSCP 检测出 7 例存在 p73 等位基因缺失, 未见突变; 定量 RT-PCR 检测出 33 例结肠癌呈高表达, 7 例呈中等表达; 非癌组织中 26 例呈低水平表达, 14 例呈中等水平表达; p73 基因在结肠癌与癌旁组织中的表达存在显著性差异 ($P < 0.01$) **结论** p73 基因以等位基因缺失、高表达方式参与结肠癌发生发展

Alteration of p73 gene in colon cancer and paracancerous tissues and its significance

LI Shan-Qu¹, CUI Da-Xiang¹, LIU Biao-Ying²,
YAN Xiao-Jun¹, SUN An-Le², GUO Yan-Hai¹,
DUAN Jie¹, SU Cheng-Zhi¹

¹Institute of Genetic Diagnosis Technology of Chinese PLA, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China, ²Center of Endoscopy, Chinese PLA 264 Hospital, Taiyuan

Keywords: colon cancer; p73 gene; quantitative RT-PCR

Abstract **AIM** To investigate the alteration of p73 gene in colon cancer and paracancerous tissues and its biological significance **METHODS** 40 specimens of colon cancers and matched paracancerous tissues were screened for mutation by PCR-SSCP and for expression levels of p73 gene by quantitative RT-PCR. **RESULTS** Seven cases of colon cancers were screened to have allele loss by PCR-SSCP and no mutation was observed. By RT-PCR, 33 specimens of colon

cancers were screened to be overexpressed, 7 specimens of colon cancers were medially expressed, 26 specimens of paracancerous tissues were lowly expressed and 14 cases were medially expressed. There was significant difference between colon cancers and paracancerous tissues ($P < 0.01$). **CONCLUSION** p73 gene may take part in the development of colon cancer.

0 引言

p73 基因是 Kaghad 等^[1]于 1997 年发现的 p53 家族的新成员, 定位于 1p36.2-36.3 此区在黑色素瘤、神经母细胞瘤、结肠癌、乳腺癌中为缺失热点区, 并且 p73 与 p53 基因在结构和功能上具有相似性, 因此, 有人认为 p73 基因可能是候选的抑癌基因。但值得注意的是 p73 与 p53 存在明显的不同。1998 年几个研究小组分别在肺癌和前列腺癌中发现 p73 蛋白高水平表达, 因此认为 p73 可能不是抑癌基因。Kaghad 等^[2]发现在健康人血细胞及神经母细胞瘤株中 p73 基因是单等位基因表达的。我们想通过检测结肠癌中 p73 基因及其等位基因的表达状况并检测其所在基因位点的突变情况, 以期探讨 p73 基因在结肠癌发生发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 结肠癌组织 40 例及相应远离癌灶的非癌组织由 264 医院消化内镜中心提供, 标本取得后立即用液氮冷却后再转至 -70℃ 冰箱保存。原发结肠癌 40 例中腺癌 36 例, 其中低分化 17 例, 中高分化 19 例; I, II 期 14 例, III, IV 期 22 例。息肉癌变 4 例, 其中 I, II 期 2 例, III, IV 期 2 例; 酚、氯仿、无水乙醇、蛋白酶 K、异丙醇等化学试剂购自原平试剂公司;

mRNA 提取采用 Promega 公司 PolyA Tract R System 1000 试剂盒, 反转录采用 SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech 公司), PCR 产物纯化试剂盒采用 Promega 公司 Wizard R Plus Miniprep DNA Purification System; α -³²P dATP

收稿日期: 1999-12-14; 修回日期: 1999-12-31

作者简介: 李陕区(1960-), 男(汉族), 陕西省兴平市人, 硕士 Tel (029) 3374772



购自北京福瑞公司; PCR 采用 Clontech 公司 Advantage 2 PCR 试剂盒; PCR 扩增仪采用 PE-5700 型定量 PCR 仪; PCR 引物采用第 2 外显子序列设计并合成. 从基因组 DNA 中扩增 p73 基因第 2 外显子引物为: P1: 5'-CA GGCCCACTTGCCCTGCC-3', P2: 5'-A GAGGTGCTCAAACGTGG-3', 扩增片段为 229 bp; RT-PCR 扩增第 2 外显子 5' 端非编码区引物为: P3: 5'-GGCTGCGACGGCTGCA GA-3', P4: 5'-CGCGGCTGCTCA TCTGGT-3'; 内参照 β actin 引物为: 5'-CACTGTGTTGGCGTACA GGT-3'; 5'-TCATCA CCA TTGCAATGA G-3', 扩增片段为 154 bp.

1.2 方法 DNA 与 RNA 提取: DNA 提取采用 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS 与蛋白酶 K 消化法; RNA 提取采用 Promega 公司 Poly A Tract R System 1000 试剂盒按说明书提取, DNA 与 RNA 提取后进行紫外扫描定量. p73 基因表达的检测: 反转录采用 P3, P4 引物与 β actin 引物以及 SMARTTM PCR cDNA Synthesis 试剂盒进行, PCR 反应条件为: 94 2 min, 94 30 s, 60 30 s, 72 30 s, 25 个循环, 最后在 72 延伸 10 min. PCR 产物进行 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖电泳分析, 结果进行扫描定量分析, 检测 $A_{260 \text{ nm}}$ (OD) 值/ β actin $A_{260 \text{ nm}}$ (OD) 值 > 2, 高表达; 在 1~2 之间, 为中等表达; < 1 为低表达. SSCP 方法检测 p73 基因突变: 取 20 μL PCR 产物, 用 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 按 1:10 稀释, 取 20 μL 稀释液与变性液 ($950 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酰胺, $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Ficoll, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA) 按 1:1 混合后煮沸变性 5 min, 冰浴速冷, 进行 $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 聚丙烯酰胺凝胶 (含甘油 $50 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$) 60 V, 4 电泳 2 h, EB 染色, 拍照.

统计学处理: 扫描结果采用 SPSS 统计软件分析处理.

2 结果

2.1 p73 基因 mRNA 的表达情况 p73 基因在结肠癌与癌旁组织之间的表达存在显著性差异 ($P < 0.01$, Tab 1), p73 基因表达程度在结肠癌组织中高分化与低分化之间存在显著性差异 ($P < 0.01$, Tab 2), p73 基因表达程度在结肠癌 I~II 期与 III~IV 期之间存在显著性差异 ($P < 0.05$, Tab 3).

2.2 PCR-SSCP 的检测结果 SSCP 分析检出 7 例存在等位基因缺失, 未见突变 (Fig 1).

3 讨论

p53 基因^[3]是迄今发现的最常见的肿瘤抑制基

表 1 癌旁组织和结肠癌组织 p73 基因 mRNA 表达

Tab 1 p73 mRNA expressional levels in colon cancer and paracancer tissues

Type	n	p73 mRNA overexpression	Medium expression	Lower expression
Paracancer	40	0	14	26
Colon cancer	40	33	0	7

表 2 不同分化程度结肠癌组织 p73 基因 mRNA 表达

Tab 2 p73 mRNA expressional levels in different differentiation colon cancer

Differentiation	n	p73 mRNA overexpression	Medium expression	Lower expression
Medium, high	21	19	0	0
Lower	19	3	0	7

表 3 p73 基因 mRNA 表达与结肠癌临床分期的关系

Tab 3 p73 mRNA expressional levels in different clinical period colon cancer

Period	n	p73 mRNA overexpression	Medium expression	Lower expression
I, II	16	9	0	7
III, IV	24	24	0	0



图 1 PCR-SSCP 的检测结果

Fig 1 Result of PCR-SSCP

1. PCR Marker; 2. Allele gene delet; 3. Normal

因 p53 蛋白通过与 DNA 的特定区域结合, 抑制细胞异常增殖, 控制其他基因表达^[4]. p53 基因突变和缺失, 丧失其功能, 使其蛋白水平下降, 抑制肿瘤的发生和发展^[5]. p73 基因是近年发现的一与 p53 基因同家族的新基因, 其编码蛋白与 p53 极其相似, 并且也可与 p53 DNA 结合的特殊位点相结合, 激活其目的基因, 导致细胞凋亡^[6]. 因此, 被认为是一候选的抑癌基因. 但最近的研究结果并不支持此观点^[7-9]. 一些作者提出了一种完全相反的观点: p73 可能是 p53

的一种模拟突变体,在细胞内p73分子可模拟p53分子行使p53分子的功能,从而使p53分子失效,造成细胞恶变,在肿瘤发生中起重要作用^[9-11]。本实验先采用定量RT-PCR技术检测p73基因在结肠癌及相应癌旁组织中的表达,结果表明癌组织中p73基因表达明显高于其相应癌旁组织($P < 0.01$),而且与组织分级、分化水平有关;p73基因高表达的原因可能是由于结肠癌发生中p73基因的改变或由于癌症发生过程中p73基因表达促进因子的激活;p73沉默的等位基因的激活表达也可引起p73基因mRNA水平的提高。为了检测结肠癌组织中是否存在沉默的等位基因的表达与突变,我们运用SSCP技术对p73基因在外显子2的杂合性进行了分析,筛选出7例存在等位基因缺失,未发现突变。此结果与文献报道一致,正常组织中p73基因是单等位基因表达,而肿瘤组织中是双等位基因表达,即沉默基因也被激活表达^[6-11]。

总之,我们的实验初步表明,p73基因以等位基因缺失、高表达方式参与结肠癌组织发生发展,至于p73基因在结肠癌发生发展中的具体作用仍有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Kaghad M, Bonnet H, Yang A *et al*. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers [J]. *Cell*, 1997; 90(2): 809-819.
- [2] White PS, Maris JA, Beltinger C *et al*. A region consistent

deletion in neuroblastoma maps within human chromosome 1p³⁶⁻²⁻³⁶⁻³ [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; 92(6): 5520-5524.

- [3] Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene [J]. *Nature*, 1991; 351(2): 453-456.
- [4] Zheng J, Wu BQ. Advancement of p53 gene research review [J]. *中华病理学杂志*, 1997; 26(2): 251-254.
- [5] Wilcock D, Lane DP. Location of p53, retinoblastoma and replication proteins at sites of viral replication in herpes infected cells [J]. *Nature*, 1991; 349(2): 429-431.
- [6] Jost CA, Marin MC, Kaelin WG. p73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis [J]. *Nature*, 1997; 389(1): 191-194.
- [7] Kunimi K, Bergerheim USR, Larsson L *et al*. Allelotyping of human prostatic adenocarcinoma [J]. *Genetics*, 1991; 11(1): 30-534.
- [8] Judith S, Verne C, Jeanne M *et al*. Parental imprinting studied by allele-specific primer extension after PCR: Paternal X chromosome-linked genes are transcribed prior to preferential paternal X chromosome inactivation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; 89(6): 10469-10473.
- [9] Watanabe M, Fukutome K, Shiraishi T *et al*. Differences in the p53 gene mutational spectra of prostate cancers between Japan and western countries [J]. *Carcinogenesis*, 1997; 18(4): 1355-1358.
- [10] Takashi H, Ichimiyama S, Nimura Y *et al*. Mutation, allelotyping and transcription analyses of the p73 gene in prostatic carcinoma [J]. *Cancer Res*, 1998; 58(15): 2076-2077.
- [11] Mai M, Yokomizo A, Qian CP *et al*. Activation of p73 silent allele in colon cancer [J]. *Cancer Res*, 1998; 58(16): 2347-2349.

编辑 许昌泰

· 文摘 · 丙型肝炎病毒NS₃蛋白C末端细胞毒T细胞表位的动力学分析

[汪涛, 郭华章, 王国力 *et al*. *中华肝病杂志*, 1999; 7(4): 207-210]

为研究丙型肝炎病毒(HCV)NS₃蛋白C末端细胞毒T细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)表位的长期演变规律,用血清学法检测了2例慢性HCV感染者的HLA分型,并以HLA结合基序为依据,预测了HLA限制的CTL表位。血清样本中的HCV基因片段用PCR扩增, Sanger法测定核苷酸序列,并翻译成蛋白质。用计算机软件分析了CTL表位的改变。结果5a和3a内预测的HLA-A2和HLA-A11限制的CTL表位在2例携带者中均未发生改变。认为HCV NS₃蛋白C末端的CTL表位可能与HCV慢性化无关。

(井晓梅 王睿)